

# KÜLÖNLENYOMAT

## A MAGYAR ORVOSI ARCHIVUM

### 1938. ÉVI 3. SZÁMÁBÓL.

---

A Ferenc József Tudományegyetem belgyógyászati klinikájának közleménye. (Igazgató: Rusznyák István ny. r. tanár.)

#### A C-VITAMIN KIMUTATÁSA A VIZELETBEN.

Irtá: Armentano Lajos dr.

A C-vitamin kimutatására szolgáló sokféle eljárásnak mind az volt a közös célja, hogy a lehető legnagyobb specificitással bírjon. Ennek elérésében — minthogy ezen reakciók legnagyobb része a C-vitamin redukáló tulajdonságán alapszik — a főakadály azon redukáló anyagok jelenléte volt, melyek a vizsgálandó anyagokban: vizelet, szövetek, stb. különböző mennyiségben vannak jelen s ezáltal a meghatározásokat annyira befolyásolhatják, hogy joggal mondhatjuk azt, hogy igazi specifikus eljárás az ascorbinsav kimutatására nincsen. Különösen a sulfhydryl származékok: cystein, cystin, glutathion, ergothionein stb. azok, melyek az ascorbinsav mennyiségi kimutatását a különböző reductiók próbákban zavarják.

Ezeket a hibaforrásokat különböző szerzők más-más uton próbálták kiküszöbölni, különösen a jód és a 2—6 dichlorphenolindophenol (Tillmanns) eljárásokban: így az oldat erős megsavanyításával (Harris és Ray, v. Euler, v. Eekelen, stb.). Emmerie ezen redukáló anyagoknak higanyacetattal történő kicsapásával, Ammon és Hinsberg a jód módszerénél KJ hozzáadásával, Tauber és Kleiner a cucurbita maximából (tök) vagy kelvirágból (Wachholder) előállított és az ascorbinsavat specifikusan oxydáló oxylase ferment alkalmazásával.

Bonsignore és Martini más uton igyekeztek a fajlagosságot biztosítani; ők abból indultak ki, hogy a methylenkék oxydoreductiók potenciálja kisebb, mint a dichlorphenolindophenolé, minek következtében nem jön számításba sok olyan vegyület, mely viszont az ascorbinsav és a dichl.-indoph. közötti reakciót zavarja. Mint-hogy a methylenkék leukomethylenkék rendszerben oxygen jelenlétében az utóbbi gyorsan reoxydálódik, említett szerzők olyan felteteleket kerestek, melyek mellett ezen reoxydatio gátolva van.

Ezt véleményük szerint két uton lehet elérni, egyrészt a kö-zek Ph-jának beállításával, másrészt natriumthiosulfat hozzáadásá-

val. Minthogy azonban a natriumthiosulfatból savanyu közegben (bizonyos ph-n alul) S hasad le, mely magá is képes a methylenkék redukálni, e hibaforrást citratpuffer hozzáadásával igyekeztek kiküszöbölni. Ily módon szerintük a rendszerben kén nem hasad le, tehát a methylenkék spontán nem szintelenedik el, viszont a natriumthiosulfat által a leukomethylenkék reoxydatiója is gátolva van. Feltéve, hogy a methylenkék és az ascorbinsav aequimolekularisan reagálnak, (methylenkék  $\equiv 373$ : ascorbinsav  $\equiv 176$ ) úgy 1 ccm 1/10.000 methylenkék oldatnak 0.047 mg ascorbinsav felel meg. *Bonsignore* és *Martini* azonban maguk is hangsúlyozzák, hogy számítva azokra a hibaforrásokra, melyek a methylenkék szennyezése, továbbá a kristályviztartalom és hydroszkopos-ságból származnak, célszerűbb a titert empirikusan beállítani.

*Bonsignore* és *Martini* ezen eljárását, melyet eredetileg a szövetekben levő C-vitamin kimutatására írtak le, felhasználták vér, vizelet stb. ascorbinsav tartalmának kimutatására. Így *Ammon* és *Hinsberg* összehasonlító vizsgálataik alapján, melyekben a methylenkék módszert a jód és *Tillmanns* módszerrel hasonlították össze, arra a meggyőződésre jutottak, hogy vizeletben a legalacsonyabb értékeket a methylenkék eljárás adja, tehát valószínűleg ez áll legközelebb az igazi értékekhez. A methylenkék módszert különböző módosításokkal sokan átvették: *Wachholder* és *Hamel* az eredeti trichloreccsav helyzett 4.4%-os sulfosalicylsavat alkalmaztak. *Lund* és *Lieck* *Bonsignore-Martinitől* függetlenül szintén eljárást dolgoztak ki methylenkével különböző pufferek alkalmazásával vizeletben natriumchlorid és  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  közegben alcoholos methylenkék oldattal titrálva).

Megjegyzendő azonban, hogy a methylenkék módszernek számos ellenzője van, akik az indophenol módszert előnyben részesítik a methylenkével szemben. (*Ley*, *Kaiser*, *Dagulf*.) Legujabban *Widenbeuer* és *Salm* a *Wachholder* által alkalmazott methylenkék módszert vizeletben egyenesen használhatatlannak minősítik, minthogy abban egyes anyagok, mint az urochrom B fractio gátolja a methylenkék és ascorbinsav közötti reakciót. Ezzel szemben *Lund* módszerét specifikusnak tartják, minthogy a vizelethez hozzáadott C-vitamint hiánytalanul vissza tudták kapni. *Wachholder* válaszában arra hivatkozik, hogy meghatározásaikban nagyobb mennyiségű sulfosalicylsavat (tizszeres mennyiségű 4.4%-ost) alkalmazott, bár így is bizonyos veszteséggel számolnia kellett.

Az elmondottak rámutatnak e módszernél a H-ion concentration fontosságára, melyre első ízben *Neuweiler* hívta fel a figyelmet. A mellékelt görbén jól látható, hogy ugyanaz a C-vitamin mennyiség (0.1 mg) különböző Ph mellett sulfosalicylsavas közegben milyen eltérő methylenkék mennyiséget képes redukálni. Míg 3.4 ph-a alul az eredmények állandók, addig e felett e redukáló képesség folyton csökken. Véleményem szerint a *Tillmanns* és methylenkék módszer között az irodalomban található óriási diffe-

renciák részben ezzel magyarázhatók. Azok az összehasonlító vizsgálatok ugyanis (200 vizsgálat alapján), melyeket Tillmanns és methylenkék módszerrel (*Wachholder* szerint) végeztem, kb. 15–20% különbséget adtak, természetesen az indophenol értékek mindig magasabbak voltak.

A jelzett methylenkék módszerrel kapcsolatosan azonban két hibaforrást voltam kénytelen megállapítani:

1. Tízszeres mennyiségű 4.4%-os sulfosalicylsavval dolgozva a közeg ph-ja igen közel van, sőt gyakran el is éri azt a pontot, amikor a thiosulfatból S hasad le, amely a methylenkéket tovább redukálva a meghatározást természetesen használhatatlanná teszi. Kétször ez abból is, hogy a vizsgálandó oldat igen gyakran zavarossá válik a kiváló kénből.

2. Sulfosalicylsavas közegben sohasem tudtam megkapni az elméleti títort annak dacára, hogy az összes előírásokat pontosan betartottam (500 Wattos Nitraphot B lámpa, hűtőeljárás, lámpatávolság, Merck-féle methylenkék purissimum, szükséges ph, stb.). Sulfosalicylsavas közegben 1 ccm 1:10.000 methylenkékre vonatkoztatva a titer 0.15–0.16 mg között ingadozott, ami háromszoros elméleti faktornak felel meg. Minthogy thiosulfat nélkül a titer még sokkal nagyobb, arra kell következtetni, hogy a sulfosalicylsav bizonyos mértékig gátolja a methylenkék reduktóját. Érdekesnek tartom ezzel kapcsolatosan megjegyezni, hogy különböző szerzők más-más títort sorolnak fel, így, míg *Widenbauer* és *Salm*, *Lund* és *Lieck*, *Wachholder* az elméleti értékhez közelálló eredményeket kaptak, addig *Ammon* és *Hinsberg* 0.087, *Neuweiler* 0.1 faktort találtak trichlor-ecetsavas közegben (előbbi 4.0%, utóbbi 8.8%-os trichloreetsavat használt). *Neuweiler* kiemeli, hogy trichloreetsavas közegben felesleges a thiosulfat alkalmazása, ami tényleg így is van, azonban ilyenkor 20%-os trichloreetsavas közeg szükséges (1 ccm vizelet — 1 ccm 40%-os trichloreetsav — 2 ccm citratpuffer, ph — 2.8–2.9). Ennél higabb trichloreetsavas oldat mellett a ph emelkedése miatt a titer fokozatosan emelkedik. A fenti beállítás mellett a titer 0.083 volt, ami már lényegesen közelebb áll az elméleti értékhez. Minthogy *Lund* és *Lieck* által ajánlott módszerrel is 1 ccm (1:10.000) methylenkének 0.12 mg C-vitamin felelt meg, ezért törekedtem olyan közeget találni, mely az ascorbinsav methylenkék oxydo-reduktós rendszerben a reakciót egyáltalában nem befolyásolja, a leukomethylenkék reoxydatiója gyorsan ne következzen be és amellet az elméleti titerhez közelálló értéket adjon. Ilyen rendszert az acetat pufferben találtam meg. Amint az ábrán látható ugyanaz a C-vitamin mennyiség (0.1 mg — 1 ccm 1:10.000 C-vitamin oldat 2%-os metaphosphorsavban oldva) ugyanazon ph mellett, de más rendszerben igen különböző mennyiségű methylenkéket képes redukálni. Acetat puffer mellett is e redukáló képesség bizonyos mértékig függ a közeg hydrogenion koncentrációjától,





1. táblázat.

D i a g n o s i s	Sulfo- salicylsav 10 ccm 4'4 0/0	Trichlor- ecetsav 1 ccm 40 0/0	5 ccm n/10 ecetsav + 5 ccm Na-acetat	Lund- módszer
	methylenkék ccm			
Purpura vasc.	0'5	0'9	1'22	0'71
Pleuritis	0'61	1'0	1'5	0'7
Lymphogranulomatosis	8'7	11'0	15'0	—
Gastritis	0'8	1'5	2'5	0'85
Ulcus ventriculi	0'9	1'7	2'7	1'0
Ulcus ventriculi	0'3	0'8	1'7	0'5
Lymphogranulomatosis	1'4	—	3'2	1'8
Ischias	0'9	—	1'8	1'25
Ischias	0'4	0'8	1'0	—
Ischias	1'1	1'7	3'1	1'5
Peritonitis tbc.	0'1	0'12	0'17	—

A módszer használhatóságának vizsgálatára kétféle eljárást alkalmaztam: 1. Meghatározásokat ugyanaból a vizeletből a különböző methylenkék eljárásokkal (1. táblázat), amely azt mutatta, hogy a különböző methylenkék módszerek közül ugyanaz a vizeletmennyiség acetat-puffer jelenlétében redukálja a legtöbb methylenkéket. Utána a trichlorecefsavas közeg, *Lund* módszer és csak ezután következik a sulfosalicylsavas közegben való meghatározás. Az arány az egyes módszerek között körülbelül ugyanaz mint a C-vitamin oldatban és így a kapott eredmények is közel állanak egymáshoz kivéve a *Lund* módszert, mellyel C-vitaminban koncentráltabb vizeletben lényegesen alacsonyabb értéket kaptam, amire különben *Dagulf* is rámutatott. Az összes methylenkék módszereknél a *Tüllmanns* eljárás mindig magasabb értékeket adott: a különbség 5—25% között ingadozott aszerint, hogy milyen volt a vizelet ascorbinsav koncentrációja.

2. Vizsgálat tárgyává tettem, hogy a vizeletekhez különböző mennyiségben hozzáadott ascorbinsavat az egyes módszerekkel milyen mértékben lehet visszakapni. Míg *Gabbe*, továbbá *Widenbauer* és *Salm* sulfosalicylsavas közegben a vizelethez hozzáadott ascorbinsavat nem tudták visszanyerni, addig *Neuweiler*, *Ferrand* és *Policard* trichlorecefsavas közegben megfelelő-ph mellett hiánytalanul kapták meg.

Kísérleteimben a vizeletekhez hozzáadott C-vitamint teljes egészében egyik módszerrel sem tudtam visszakapni (2. táblázat); kis mennyiségű (10 mg) ascorbinsav hozzáadásakor mind sulfosalicylsav, mind acetat-puffer jelenlétében methylenkék módszerrel a

2. táblázat.

Diagnosis, napi vizeletmennyiség ccm			Vizelet ascorbinsav tart. mg		Hozzáadott ascorbinsav mg		Számított érték mg		Kapott érték mg		Veszteség			
											Tillmans		Bonsignore Martini	
			T	BM	T	BM	T	BM	T	BM	mg	‰	mg	‰
Ulc. ventr.	670	2'4	Q	+10	12'4	10'0	6'9	8'7	5'5	55	1'3	13		
Endocard.	930	3'5	3'4	+10	13'5	13'4	7'1	13'2	6'4	64	0'2	2		
Hypertonia	1000	6'6	3'3	+10	16'6	13'3	14'8	13'0	1'8	18	0'3	3		
Cholelith.	1500	5'5	1'7	+10	15'5	11'7	11'0	8'95	4'0	40	2'8	28		
Myod. cord.	500	12'0	2'0	+10	22'0	12'0	20'5	10'5	1'5	15	1'5	15		
Periton. tbc.	650	11'0	6'6	+10	21'0	16'6	19'5	13'6	1'5	15	3'0	30		
Vitium	1500	3'4	1'5	+10	5'3'4	51'5	50'2	44'5	3'2	6'4	7'0	14		
Pleuritis	1500	6'0	Q	+10	55'0	50'0	53'0	43'5	3'0	6'0	6'5	13		
Ulc. ventr.	1500	4'2	Q	+10	54'2	50'0	50'1	48'1	4'1	8'2	1'9	37		

veszteség cca. 2 mg (20‰), nagyobb mennyiségű (50 mg) mellett a veszteség 3—7 mg-a (6—14‰-t) tett ki. Viszont *Tillmanns* eljárásával is a veszteség kis mennyiségű C-vitamin hozzáadásánál elérte a 20‰-t, sőt néha meg is haladta. Ugy látszik tehát, hogy a vizeletben tényleg vannak olyan anyagok, amelyek a nehéz fémsókhoz hasonlóan az ascorbinsav és methylenkék közötti reakciót gátolják, azonban véleményem szerint ez sohasem olyan mérvű, amint azt *Widenbauer* és *Salm* feltételezi, különösen akkor, ha a szükséges ph-t pontosan betartjuk és sulfosalicylsav helyett acetat-puffert alkalmazunk.

**Összefoglalás:** Az ascorbinsavnak methylenkéekkel történő meghatározása igen sok hibaforrást rejthet magában. Ennek kiküszöbölésében legfontosabb azon közeg ph-jának pontos betartása, melyben a reactio végbemegy. Ugyanazon ph mellett is azonban az ascorbinsav methylenkéket redukáló képessége nagy mértékben függ a puffer rendszertől. Minthogy ugyanazon C-vitamin mennyiség optimális ph mellett is acetat-puffer jelenlétében képes legtöbb methylenkéket redukálni, ami által legközelebb jutunk az elméleti faktorhoz, ezt a rendszert kell legalkalmasabbnak minősíteni, annál is inkább, minthogy a *Bonsignore* és *Martini* eredeti eljárásában katalysatorként szereplő natriumthiosulfat teljesen feleslegessé válik és így nem kell számolni azzal a hibaforrással, hogy az erősen savi közegben lehasadó kén a methylenkéket tovább redukálja. A methylenkék-ascorbinsav közötti reactio cupri és ferri ionok már igen kis mennyiségben gátolják, amennyiben a keletkező leukomethylenkék a fenti ionokat azonnal cupro és ferro ionokká redukálja. 0.1 mg ascorbinsav reduktíós hatását 0.1—0.2 ccm

1%-os cuprisulfat látszólag tökéletesen megakadályozza. A használandó methylenkék oldatnak és a vizsgált anyagnak tehát cupri és ferri ionoktól tökéletesen mentesnek kell lenni. A vizeletben kétségtelenül vannak anyagok (urochrom B), amelyek az ascorbinsav reduktió hatását gátolják, azonban megfelelő ph mellett és acetatpuffer alkalmazásával a gátló hatás következtében előálló veszteség kis mennyiség (10 mg) mellett legfeljebb 20%, nagyobb mennyiségű ascorbinsav (50 mg) hozzáadásakor a veszteség 6—14%-t tesz ki.

*Irodalom: Ammon u. Hinsberg: Klin. Wsch. 1936. I. 85. — Bonsignore u. Martini: Biochem. Z. 273, 170, 1934. — Dagulf: Ascorbinsäurestudien etc. Göteborg, 1939. — Emmerie u. Eekelen: Biochem. J. 28, 268, 1153, 1939. — Ferrand u. Policard: Klin. Wschr. 1937, I. 347. — Gabbe: Klin. Wschr. 1936. I. 292. — Harris u. Ray: Lancet 71, 1935. — Kaiser: Angew. Chem. 752. 1936. — Ley: Arch. Gynäk. 164, 408, 1937. — Lund u. Lieck: Klin. Wschr. 1937, I. 748. — Neuweiler: Klin. Wschr. 1936, I. 854. — Straub: Hoppe-Seylers Z. 254, 192, 1938. — Tauber u. Klciner: Journ. biol. Chem. 108, 563, 110, 559, 1935. — Wachholder u. Podesta: Hoppe-Seylers Z. 239, 149, 1936. — Wachholder u. Hamel: Klin. Wschr. 1937, I. 10. — Wachholder: Klin. Wschr. 1938, II. 16661. — Widenbauer u. Salm: Klin. Wschr. 1938. II. 1407.*

#### L. Armentano: Bestimmung der „C“ vitamin im Harn.

Bei der Bestimmung der Ascorbinsäure mit Methylenblau hat man mit zahlreichen Fehlerquellen zu rechnen; um diese zu vermeiden, ist es besonders wichtig, die PH jedes Mediums, in dem die Reaktion vor sich geht, genau einzuhalten. Auch bei der Einstellung der Versuchsbedingungen auf dieselbe PH hängt aber die Fähigkeit der Ascorbinsäure, Methylenblau zu reduzieren in hohem Masse vom Puffersystem ab. Da dieselbe Vitamin C Menge auch bei optimaler PH die grösste Methylenblau-Menge in Gegenwart von Acetat-Puffer reduzieren kann, wodurch der theoretische Faktor am ehesten erreicht wird, ist dieses System als das geeignetste anzusprechen. Diese Ansicht erscheint umso mehr berechtigt, da das is der ursprünglichen Vorschrift von *Bonsignore* und *Martini* die Rolle des Katalysators spielende Natriumthiosulfat vollkommen überflüssig geworden ist, so dass man auch nicht mehr mit der Fehlerquelle zu rechnen hat, dass der im stark saueren Medium abgespalten Schwefel das Methylenblau weiter reduziere. Die zwischen Methylenblau und der Ascorbinsäure ablaufende Reaktion wird durch die Cupri- und Ferri-Ionen blos in grossem Grade gestört, da diese durch das entstehende Leukomethylenblau sofort zu Cupro- und Ferro-Ionen reduziert werden. Die reduktorische Wirkung von 0.1 mg Ascorbinsäure wird durch 0.1 bis 0.2 ccm der 1% Cuprisulfatlösung scheinbar vollkommen gehemmt. Die zur Verwendung gelangende Methylenblaulösung und das Untersuchungsmaterial müssen daher vollkommen frei von Cupri- und Ferri-Ionen sein. Im Harn gibt es zweifellos Stoffe (Urochrom B), durch die die reduzierende Wirkung der Ascorbinsäure gehemmt wird, bei entsprechender PH und bei Verwendung des Acetat-Puffers erreicht jedoch der durch die Hemmung entstandene Verlust bloss mässige Grade. Der Verlust beträgt bei geringen Mengen (10 mg) höchstens 20—30% bei grösseren Ascorbinsäuremengen (50 mg) 6 bis 14%.

#### L. Armentano: On the determination of vitamin C in Urine.

The determination of ascorbic acid by means of the methylene blue method involves many sources of error. In order to avoid these it is of

great importance to maintain the ph of the medium in which the reaction takes place. Even at the same ph the ability of ascorbic acid to reduce methylene blue is primarily depending upon the buffer system. Since even at an optimal ph the same amount of vitamin C is capable of reducing the greatest quantity of methylene blue in the presence of an acetate buffer this system is to be considered as the most adequate one. This consideration is the more justified as the use of sodiumthiosulfate, which is applied as a catalyzer in the original method of *Bonsignore-Martini*, becomes entirely superfluous, and the source of error, caused by the fact that the sulphur released in highly acid medium may reduce methylene blue still further, is eliminated. The reaction between methylene blue and ascorbic acid may be inhibited by even the smallest amounts of cupric and ferric ions as the developed leukomethylene blue reduces them immediately to cupro and ferro ions. The reducing effect of 0.1 mg ascorbic acid may be completely inhibited by 0.1—0.2 cc. of a 1% solution of cupric sulphate. That is the reason why both the solution of methylene blue and the test material should be void of ferric and cupric ions. It is doubtless that urine contains substances (urochrome B) capable of inhibiting the reducing power of ascorbic acid, nevertheless, the use of an adequate ph and acetate buffer diminishes the loss produced by the inhibition to but a moderate degree. The loss due to the inhibiting effect is, if most, 20—30% when small amounts of ascorbic acid (10 mg) are present while the presence of larger amounts (50 mg) diminishes the loss to but 6—14%.